

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.09.006

· 基础研究 ·

miR-503 靶向 ERCC1 抑制食管鳞状细胞癌放疗抵抗作用的机制

孔蕾¹, 王俊杰², 王济东¹, 于甬华³, 张颖东¹, 崔迪¹, 张永³, 付志雪¹ (1. 北京大学国际医院 放疗科, 北京 102200; 2. 北京大学第三医院 放疗科, 北京 100191; 3. 山东省肿瘤医院 放疗科, 山东 济南 250117)

[摘要] **目的:**探讨 miR-503 通过调控人切除修复交叉互补基因 1 (ERCC1) 介导食管鳞状细胞癌 (ESCC) 放疗抵抗作用的分子机制。**方法:**采用 qPCR 法检测在放疗抵抗的 ESCC 肿瘤组织及 KYSE140、KYSE140R 细胞中 miR-503 的表达水平。将 miR-503 模拟物、miR-503 抑制物或 si-ERCC1 转染至 KYSE140 和 KYSE140R 细胞中, 经射线照射后, 克隆形成实验和 CCK-8 实验检测 KYSE140R 细胞的增殖活力, 流式细胞仪检测 KYSE140R 细胞的凋亡情况, WB 实验检测 ERCC1 蛋白表达水平的变化。双荧光素酶报告基因验证 miR-503 与 ERCC1 的靶向关系。**结果:**miR-503 在 ESCC 放疗抵抗组织和细胞中均低表达 (均 $P < 0.01$)。过表达 miR-503 可显著抑制 KYSE140R 细胞增殖并诱导细胞凋亡 (均 $P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因实验证实 ERCC1 是 miR-503 的靶基因, 且 miR-503 负调控 ERCC1 的表达。过表达 miR-503 显著下调 KYSE140、KYSE140R 细胞中 ERCC1 表达水平 (均 $P < 0.01$), 并显著抑制细胞增殖活力 (均 $P < 0.01$)、显著提高细胞凋亡率 (均 $P < 0.01$); 敲降 ERCC1 有类似作用, 而同时敲降 ERCC1 和 miR-503 则逆转以上影响。**结论:**过表达 miR-503 通过靶向 ERCC1 调控 KYSE140R 细胞对放疗的敏感性。

[关键词] 食管鳞癌; miR-503; 切除修复交叉互补基因; 放疗抵抗

[中图分类号] R392.12; R735.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)09-0969-07

Mechanisms of miR-503 inhibiting radio-resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting ERCC1

KONG Lei¹, WANG Junjie², WANG Jidong¹, YU Yonghua³, ZHANG Yingdong¹, CUI Di¹, ZHANG Yong³, FU Zhixue¹ (1. Department of Radiation Oncology, Peking University International Hospital, Beijing 102200, China; 2. Department of Radiation Oncology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 3. Department of Radiation Oncology, Shandong Cancer Hospital, Ji'nan 250117, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of miR-503 modulates radio-resistance of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by targeting excision-repair cross-complementing 1 (ERCC1). **Methods:** The expression level of miR-503 in radio-resistant ESCC tumor tissues and KYSE140 and KYSE140R cells was detected by qPCR. The miR-503 mimic, miR-503 inhibitor or si-ERCC1 was transfected into KYSE140 and KYSE140R cells. After radiation treatment, the colony formation assay and CCK-8 assay were used to detect the proliferation of KYSE140R cells. Flow cytometry was used to detect apoptosis of KYSE140R cells. WB was used to detect changes in protein expression of ERCC1. Dual luciferase reporter gene assay was used to validate the targeting relationship between miR-503 and ERCC1. **Results:** The expression level of miR-503 was down-regulated in radio-resistant tissues and ESCC cell lines (all $P < 0.01$). Over-expression of miR-503 significantly inhibited cell proliferation and promoted apoptosis of KYSE140R cells (all $P < 0.01$). Dual-luciferase reporter assay validated that ERCC1 was a target gene of miR-503, and miR-503 negatively regulated the expression of ERCC1. Over-expression of miR-503 significantly down-regulated the expression of ERCC1 in KYSE140 and KYSE140R cells (both $P < 0.01$), inhibited cell proliferation (both $P < 0.01$), but significantly increased apoptosis rate (all $P < 0.01$); knockdown of ERCC1 exhibited a similar effect, while knockdown of both ERCC1 and miR-503 reversed the above effects. **Conclusion:** Over-expression of miR-503 up-regulated the radio-sensitivity of KYSE140R cells by targeting ERCC1.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); miR-503; excision-repair cross-complementing 1 (ERCC1); radiotherapy-resistance

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(9): 969-975. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.09.006]

[作者简介] 孔蕾 (1976-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事食管癌的放疗及靶向治疗的研究, E-mail: hz2893@sina.com

[通信作者] 王俊杰 (WANG Junjie, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肿瘤综合治疗相关的基础与临床研究, E-mail: junjiew_edu@sohu.com

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是人类常见的恶性肿瘤之一,在中国发病率较高^[1]。ESCC预后极差,III期患者5年总生存率仅为10%~15%^[2]。放疗是现今治疗ESCC最有效的手段之一,但仍有40%~60%的患者治疗无效或复发^[3],放疗抵抗是影响肿瘤治疗效果和患者生存预后的重要因素^[4]。因此,寻找调控ESCC放疗抵抗相关的分子机制是提高ESCC癌患者放疗效果的关键途径。miRNA参与调控多种肿瘤的放疗抵抗^[5-8]。miR-503通过抑制WEE1来增强喉癌细胞的放疗敏感性^[6],其缺失促进了腺癌细胞的放疗耐受^[7]。近期研究^[9]表明,miR-503在ESCC细胞中低表达,同时靶向Cyclin D1促进ESCC细胞的增殖、迁移和侵袭。目前尚少有文献报道miR-503介导ESCC放疗抵抗性的分子机制,本研究检测miR-503对ESCC放疗抵抗性细胞生物学行为的影响,并进一步探讨miR-503通过靶向调控下游基因介导ESCC放疗抵抗作用的机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2016年1月至2018年2月北京大学国际医院肿瘤放疗科收治的资料完整的ESCC患者23例,经手术切除的ESCC组织迅速保存于液氮中。患者在放射治疗后1个月做胸部增强CT扫描、食管钡餐造影,参照X线评价标准进行疗效评价,其中放疗抵抗8例、放疗敏感15例。入选标准:(1)经病理证实,食管钡餐X片和CT检查后确诊为ESCC的初治患者;(2)按北京大学国际医院肿瘤放疗科治疗规范接受并完成标准的单纯根治性放疗,放疗剂量为1.8~2.0 Gy/次、1次/d,5次/周,总剂量为60~70 Gy。排除标准:(1)患者不同意标本的采集;(2)不能耐受手术的患者;(3)合并有免疫系统疾病的患者。所有研究对象研究前均签署知情同意书,研究方案经北京大学国际医院医学伦理委员会审查并批准。

1.2 细胞与主要试剂

ESCC细胞TE12、KYSE510、KYSE140和人正常食管黏膜上皮细胞NE2均购自中国科学院上海细胞研究所。将TE12、KYSE510、KYSE140细胞用含有10%胎牛血清和100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养基于37℃、5%CO₂培养箱中常规培养。

miR-503模拟物/抑制物和靶向切除修复交叉互补基因(excision-repair cross-complementing 1, ERCC1)的小干扰RNA si-ERCC1载体均购自上海吉玛公司,高纯总RNA快速提取试剂盒购自长沙联博志

达生物技术公司,SYBR Green法PCR试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司,逆转录试剂盒购自大连瑞真生物技术有限公司,Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒、免疫印迹一抗(antibody-ERCC1)和二抗(羊抗鼠IgG)均购自美国BD Biosciences公司。

1.3 放疗抵抗细胞株KYSE140R的构建

取对数生长期KYSE140细胞,用直线加速器6 MV射线进行照射,剂量为2 Gy。更换新鲜的RPMI-1640培养基,观察细胞活力,对无明显死亡的细胞株加大照射剂量,反复传代培养,直至该细胞能在6 Gy射线下稳定存活,收集该细胞即ESCC放疗抵抗细胞株KYSE140R。

1.4 细胞转染

使用Lipofectamine 2000试剂盒分别将miR-503模拟物、miR-503抑制物或si-ERCC1转染至KYSE140和KYSE140R细胞中,转染后将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱内培养48~72 h,筛选稳定转染的细胞株。

1.5 qPCR检测ESCC组织和细胞中miR-503的表达

采用TRIzol一步法提取总RNA,并取2 μg总RNA反转录为cDNA。以U6为内参(引物序列见表1,F:正向引物;R:反向引物),按SYBR Green实时PCR试剂盒说明建立终体积为20 μl的PCR反应体系。PCR热循环参数为:95℃、5 min,然后3步反应:94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,进行45个循环。检测结果采用2^{-ΔΔCt}法进行计算。

表1 PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences for PCR

Gene	Primer sequence
miR-503	F: 5'-TAGCAGCGGGAACAGTTCTGCAG-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
ERCC1	F: 5'-GCCGCATCAAGAGAAGAT-3' R: 5'-AAGAAGAGGAAGAAGCAGAG-3'
U6	F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' R: 5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'

1.6 克隆形成实验检测KYSE140和KYSE140R细胞克隆形成能力的不同

用胰蛋白酶消化KYSE140和KYSE140R细胞,按500个/孔接种于6孔板,24 h后分别给予单剂量3 Gy和6 Gy射线照射。于37℃培养箱中培养14 d后,移去培养液,PBS洗2次,甲醇固定15 min,1%结晶紫染色,显微镜下计数细胞克隆(大于50个细胞记为

1 个克隆)。

1.7 CCK-8 实验检测 KYSE140 和 KYSE140R 细胞增殖情况

实验前 1 d 将对数生长期的 KYSE140 和 KYSE140R 细胞接种于 96 孔板, 500 个/孔, 每孔加入 2 ml, 培养 24 h 后, 应用 6 MV 射线在不同剂量(2、4、6、8、10 Gy)下照射细胞, 照射结束后将细胞置于 37 °C 培养箱中培养 48 h。于待测前向培养孔内加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 1 h, 用酶标仪于 450 nm 下检测光密度(D)值, 每组设置 3 个重复孔。测算 IC₅₀ 值。如前所述方法接种细胞, 分别在 3 Gy 和 6 Gy 射线下对 KYSE140 和 KYSE140R 细胞进行放射处理, 培养适当时间(0、24、48、72、96 h), 于相应时间点按上述方法测量 450 nm 处 D 值, 绘制细胞增殖曲线。

1.8 流式细胞术检测 KYSE140 和 KYSE140R 细胞凋亡水平

将 KYSE140 和 KYSE140R 细胞接种于 6 孔板, 24 h 后分别给予单剂量 3 Gy 和 6 Gy 射线照射。培养 24 h 后, 收集细胞并用 PBS 冲洗 2 次。将细胞与 500 μ l 预冷的 1 \times 结合缓冲液和 5 μ l Annexin-V-FITC 混合, 室温避光孵育 15 min, 上机前 5 min 加入 2.5 μ l PI, 使用流式细胞仪检测细胞的凋亡率, 采用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.9 WB 检测 KYSE140 和 KYSE140R 细胞 ERCC1 蛋白的表达

使用 RAPI 裂解液提取 KYSE140 和 KYSE140R 细胞总蛋白, 依照二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液中加入萃取的蛋白, 加热至 95 °C, 维持 10 min。10% SDS-PAGE 分离蛋白后, 转膜、封闭, 加入一抗, 4 °C 下过夜培养。TBST 冲洗蛋白 3 次, 加入二抗, 温室中培养 1 h。洗膜 3 次后加

入化学发光试剂显影蛋白。 β -actin 用作内参, Bio-rad Gel DoIEZ 成像器拍照, 采用 Image J 软件分析靶带的灰度水平。

1.10 双荧光素酶报告基因法检测 miR-503 的靶基因

构建 ERCC1-Wt 和 ERCC1-Mut 的报告基因质粒, 将其分别与 miR-NC 和 miR-503 共转染于 KYSE140 细胞中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 收集细胞后 PBS 清洗, 用 PLB 裂解细胞, 取上清液 10 μ l 于 96 孔板, 加入 10 μ l Luciferase Assay Reagent II, 检测荧光素酶反应强度。

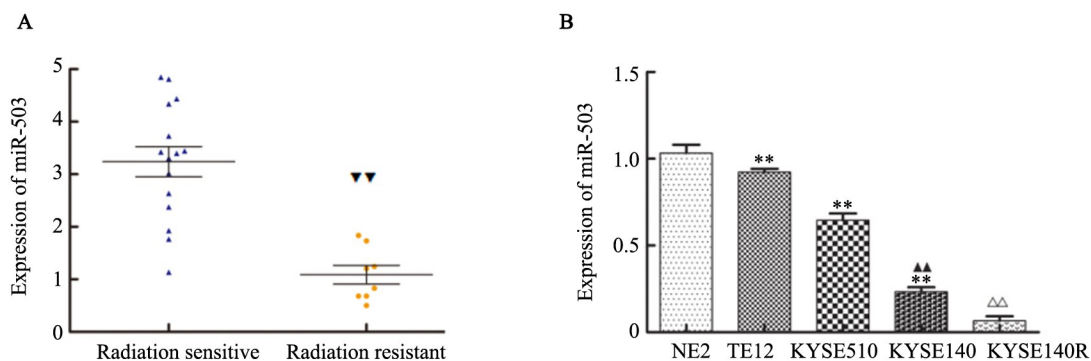
1.11 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 所有实验独立重复 3 次。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。采用 Graphpad Prism 6 软件绘图。以 *P*<0.05 和 *P*<0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-503 在 ESCC 放疗抵抗的肿瘤组织与细胞中低表达

qPCR 检测结果显示, miR-503 在 ESCC 患者放疗抵抗组肿瘤组织中的表达水平显著低于放疗敏感组($t=6.35, P<0.01$; 图 1A)。同时, miR-503 在 ESCC 细胞系中的表达水平明显低于人正常食管黏膜上皮细胞 NE2($F=319.28, P<0.01$; 图 1B), 且 KYSE140 细胞中 miR-503 的表达水平显著低于 TE12 和 KYSE510 细胞($F=427.47, P<0.01$; 图 1B), 因此选择 KYSE140 细胞进行后续实验。此外, 放疗抵抗 KYSE140R 细胞中 miR-503 的表达水平显著低于其亲本 KYSE140 细胞($t=7.81, P<0.01$; 图 1B)。



▼▼*P*<0.01 vs Radiation sensitive group; ***P*<0.01 vs NE2 group; ▲▲*P*<0.01 vs TE12 or KYSE510 group; △△*P*<0.01 vs KYSE140 group

A: The expression level of miR-503 in radiation sensitive tissue and radiation resistant tissues was measured by qPCR;

B: The expression level of miR-503 in ESCC cell lines was measured by qPCR

图1 miR-503 在食管鳞状细胞癌组织和细胞中的表达情况

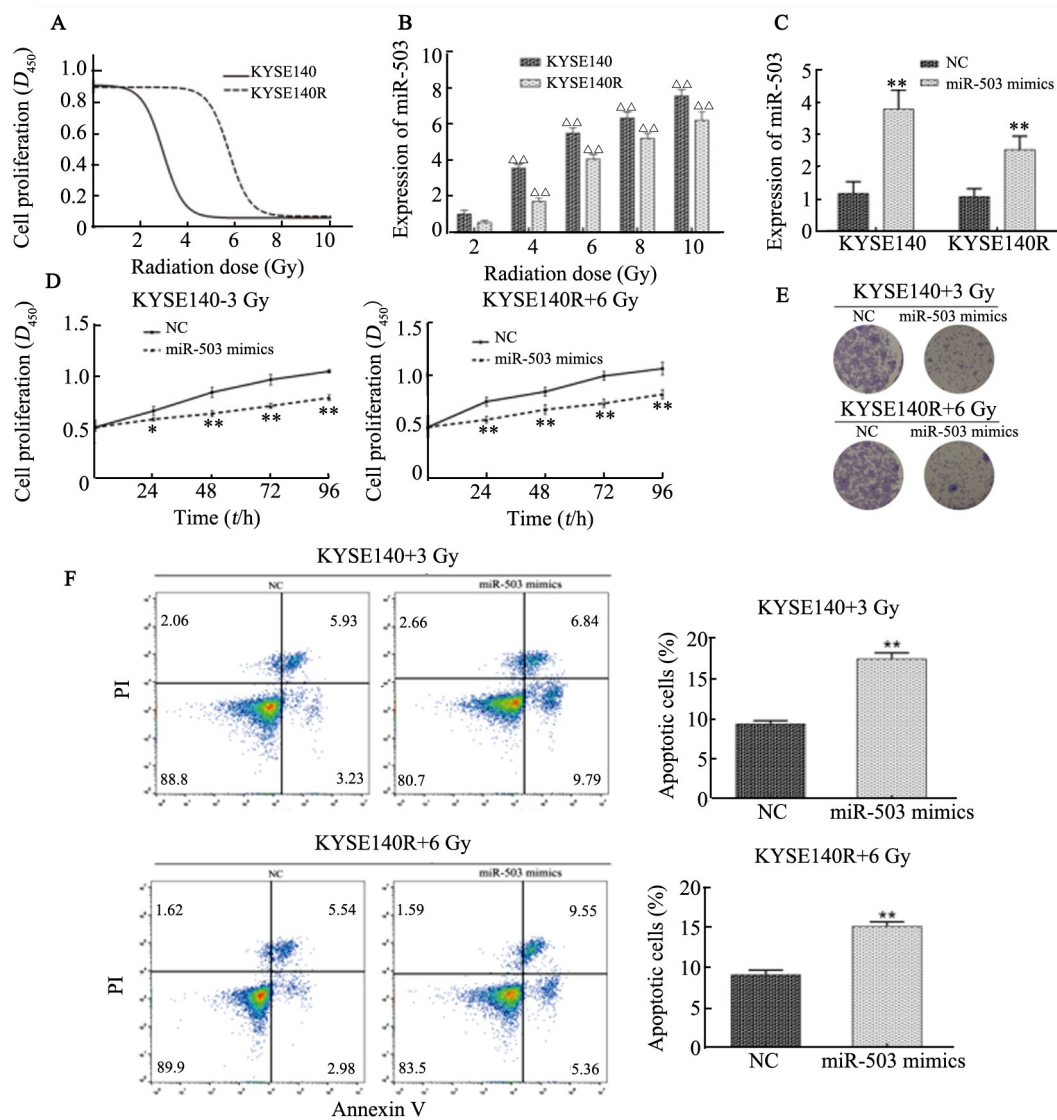
Fig.1 The expression of miR-503 in ESCC tissues and cell lines

2.2 过表达 miR-503 缓解 KYSE140/KYSE140R 细胞的放疗抵抗

CCK-8 实验结果(图 2A)显示,随着放射剂量的递增, KYSE140 和 KYSE140R 细胞增殖活力均受到抑制(KYSE140: $IC_{50}=2.94$ Gy; KYSE140R: $IC_{50}=5.95$ Gy)。qPCR 检测结果(图 2B)显示,随着放疗剂量的增加, miR-503 在 KYSE140 和 KYSE140R 细胞中表达上调($F_{KYSE140}=237.96, F_{KYSE140R}=199.28$, 均 $P<0.01$)。

转染 miR-503 模拟物可显著上调 KYSE140 和 KYSE140R 细胞中 miR-503 的表达水平($t_{KYSE140}=6.47, t_{KYSE140R}=5.21$, 均 $P<0.01$; 图 2C)。CCK-8 实验结果(图

2D)表明,过表达 miR-503 显著降低 KYSE140 和 KYSE140R 细胞增殖活力(KYSE140: $t_{24h}=3.06, P<0.05, t_{48h}=6.50, t_{72h}=7.80, t_{96h}=14.25$, 均 $P<0.01$; KYSE140R: $t_{24h}=5.60, t_{48h}=4.72, t_{72h}=8.00, t_{96h}=5.67$, 均 $P<0.01$)。克隆形成实验结果(图 2E)同样证实,过表达 miR-503 减少 KYSE140 和 KYSE140R 细胞克隆形成数($t_{KYSE140}=13.56, t_{KYSE140R}=14.85$, 均 $P<0.01$)。流式细胞术检测结果(图 2F)表明,过表达 miR-503 可显著促进 KYSE140 和 KYSE140R 细胞的凋亡($t_{KYSE140}=20.89, t_{KYSE140R}=19.57$, 均 $P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 2 Gy group

A: The cell proliferation ability under different radiation dose was measured by CCK-8; B: The expression level of miR-503 under different radiation dose was measured by qPCR; C: The expression level of miR-503 in KYSE140 and KYSE140R cells was measured by qPCR; D: The cell proliferation ability was measured by CCK-8; E: Cell viability was detected by colony formation assay ($\times 100$); F: The percentage of apoptotic cells was detected by Annexin V-FITC/PI flow cytometer assay

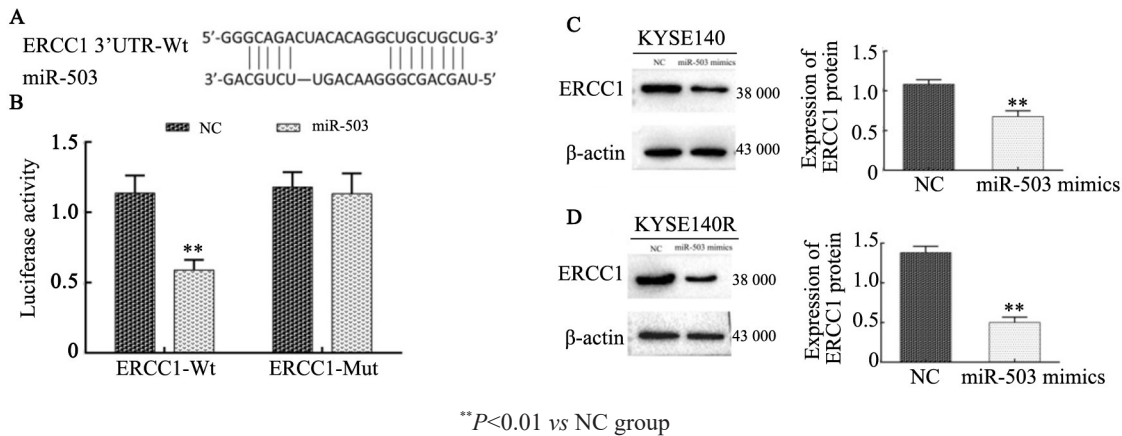
图 2 miR-503 对 KYSE140/KYSE140R 细胞放疗抵抗的作用

Fig.2 The effect of miR-503 on radio-resistance of KYSE140/KYSE140R cells

2.3 ERCC1 是 miR-503 的靶基因

借助生物信息学数据库 StarBase 3.0 和 miRmap 对 miR-503 的靶基因进行预测, 发现 ERCC1 可能是 miR-503 的靶基因(图 3A)。双荧光素酶报告基因检测结果(图 3B)证实, 共转染 pmirGLO-ERCC1-Wt/miR-503 的 KYSE140 细胞中, 荧光素酶活性显著降

低($t=6.52, P<0.01$), 而共转染 pmirGLO-ERCC1-Mut/miR-503 的 KYSE140 细胞中荧光素酶活性与对照组无显著差异($t=0.46, P>0.05$)。WB 检测结果(图 3C、D)表明, 过表达 miR-503 显著下调 ERCC1 蛋白在 KYSE140 和 KYSE140R 细胞中的表达水平($t_{KYSE140}=7.78, t_{KYSE140R}=14.64$, 均 $P<0.01$)。



A: The bioinformatics analysis result showed that miR-503 had a binding site with ERCC1; B: The luciferase activity in ERCC1-Wt transfected miR-503 was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C and D: The expression of ERCC1 protein was measured by WB

图3 ERCC1 是 miR-503 的靶基因

Fig.3 ERCC1 was a target gene of miR-503

2.4 miR-503 靶向 ERCC1 调控 KYSE140/KYSE140R 细胞的放疗抵抗

WB 检测结果(图 4A、B)显示, 敲降 ERCC1 显著下调 KYSE140 和 KYSE140R 细胞中 ERCC1 蛋白的表达水平($t_{KYSE140}=8.63, t_{KYSE140R}=6.47$, 均 $P<0.01$); 同时敲降 ERCC1 和 miR-503, ERCC1 蛋白的表达水平与对照组的差异无统计意义($t_{KYSE140}=1.19, t_{KYSE140R}=0.96$, 均 $P>0.05$)。CCK-8 检测结果(图 4C)表明, 敲降 ERCC1 显著降低 KYSE140 和 KYSE140R 细胞增殖能力(KYSE140: $F_{24h}=7.86, P<0.05, F_{48h}=32.68, F_{72h}=5.14, F_{96h}=24.59$, 均 $P<0.01$; KYSE140R: $F_{24h}=21.34, F_{48h}=40.48, F_{72h}=58.89, F_{96h}=43.61$, 均 $P<0.01$), 而同时敲降 ERCC1 和 miR-503 则对 KYSE140 和 KYSE140R 细胞的增殖能力无显著影响(均 $P>0.05$)。克隆形成实验和流式术检测结果(图 4D、E)进一步证实, 敲降 ERCC1 显著抑制 KYSE140 和 KYSE140R 细胞活力, 促进凋亡(细胞活力: $t_{KYSE140}=13.38, t_{KYSE140R}=11.78$, 均 $P<0.01$, 图 4D; 凋亡: $t_{KYSE140}=17.15, t_{KYSE140R}=15.72$, 均 $P<0.01$, 图 4E), 而同时敲降 ERCC1 和 miR-503 与对照组相比差异无统计显著性($P>0.05$)。

3 讨论

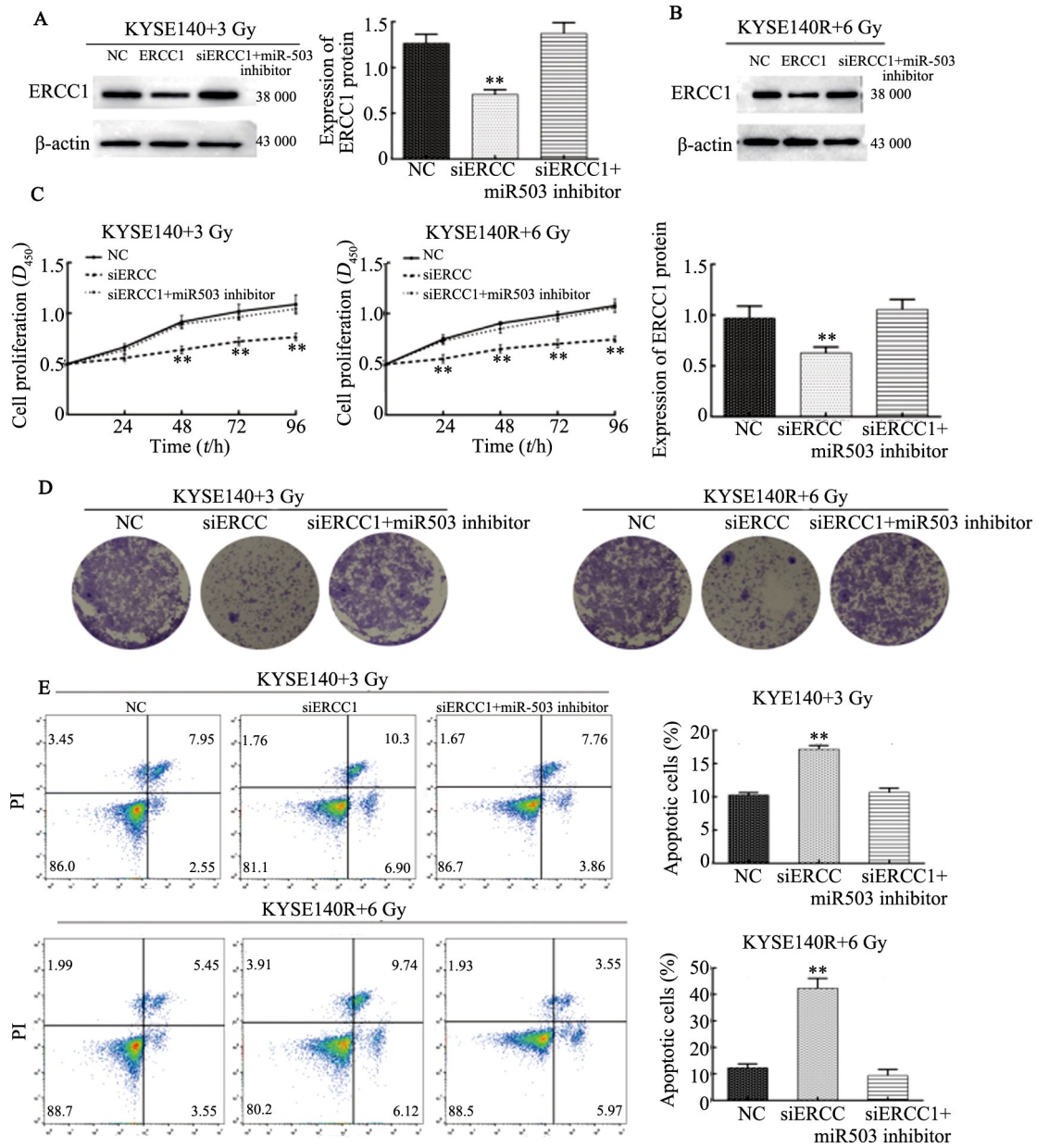
中国国家癌症中心发布的 2018 年全国癌症报告

显示, 中国 90% 以上的食管癌被确诊为 ESCC, 其发生与长期吸烟、重度饮酒、吞烫食有关^[10-11], 多发于中老年男性。目前, ESCC 的治疗以放疗为主, 多项研究^[12-14]表明 ESCC 产生放疗抵抗是导致治疗失败重要原因, 而 miRNA 是调控多种肿瘤放疗抵抗的关键因素^[15-16]。miR-503 在多种癌细胞和组织中低表达^[17-18], 其表达情况可能与调控肿瘤放疗抵抗有关。MA 等^[6]报道, 过表达 miR-503 可提高喉管癌细胞的放疗敏感性。RUTH 等^[7]研究表明, 在乳腺癌肿瘤细胞中表达 miR-503 可提高其放疗敏感性。BARGIELA-IPAR-RAGUIRRE 等^[9]发现, miR-503 在辐射治疗的胃癌细胞中低表达, 并与胃癌细胞放疗抵抗有关。本研究发现, miR-503 在 ESCC 放疗抵抗组织及细胞中低表达, 同时其在放疗抵抗细胞株 KYSE140R 中的表达水平显著低于亲本株 KYSE140, 据此推测 miR-503 的低表达可能与 ESCC 放疗抵抗有相关性。进一步研究发现, 过表达 miR-503 显著降低 KYSE140R 细胞的增殖能力、促进细胞凋亡, 从而提高 KYSE140R 细胞对放疗的敏感性。

ERCC1 编码核苷酸切除修复蛋白, 参与放疗诱导的 DNA 损伤修复^[20], 进而增强癌细胞的放疗抵抗性^[21-22]。有研究^[23]表明, 宫颈癌细胞经放射处理后, 其 ERCC1 表达显著上调并与放疗抵抗相关。另有研

究^[24]表明, ERCC1 在放疗敏感的胶质瘤细胞株中的表达水平低于放疗不敏感的胶质瘤细胞株。本研究利用双荧光素酶报告基因检测证实, ERCC1 是 miR-

503 的靶基因。过表达 miR-503 靶向调控 ERCC1 降低 KYSE140R 细胞的增殖活力并促进细胞凋亡, 从而增加 KYSE140R 细胞的放疗敏感性。



**P<0.01 vs NC or si ERCC1+miR-503 inhibitor group

A and B: The expression of ERCC1 protein was measured by WB; C: The cell proliferation ability was measured by CCK-8;

D: The cell viability was detected by colony formation assay; E: The percentage of apoptotic cells was detected by

Annexin V-FITC/PI flow cytometer assay

图4 miR-503 靶向 ERCC1 调控 KYSE140/KYSE140R 细胞的放疗抵抗性

Fig.4 miR-503 regulated radio-resistance of KYSE140/KYSE140R cells by targeting ERCC1

综上所述, 本研究揭示了 miR-503 靶向 ERCC1 调控 ESCC 放疗抵抗的相关作用机制, 过表达的 miR-503 靶向下调 ERCC1 的表达水平, 进而抑制 KYSE140R 细胞的放疗抵抗性。此外, 在本课题组的后续研究中, 将进一步探讨 miR-503/ERCC1 介导的下游信号通路对 ESCC 放疗抵抗性的作用机制。

[参考文献]

[1] MIMURA K, YAMADA L, UJIIE D, et al. Immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma: a review[J]. Fukushima J Med Sci, 2018, 64(2): 46-53. DOI: 10.5387/fms.2018-09.
 [2] HE Y, MINGYAN E, WANG C, et al. CircVRK1 regulates tumor

- progression and radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma by regulating miR-624-3p/PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J/OL]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 116-123[2019-03-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018355168?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.273.
- [3] BERGER B, BELKA C. Evidence-based radiation oncology: oesophagus[J]. *Radiother Oncol*, 2009, 92(2):276-290. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.02.019.
- [4] ZHANG Y, CHEN H, ZHU H, et al. CBX8 promotes tumorigenesis and confers radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma cells through targeting APAF1[J/OL]. *Gene*, 2019, 711: 143949 [2019-03-20]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111919305992?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.gene.2019.143949.
- [5] GUPTA G, CHELLAPPAN D K, DE JESUS ANDREOLI PINTO T, et al. Tumor suppressor role of miR-503[J]. *Panminerva Med*, 2018, 60(1): 17-24. DOI: 10.23736/s0031-0808.17.03386-9.
- [6] MA H, LIAN R, WU Z, et al. MiR-503 enhances the radiosensitivity of laryngeal carcinoma cells via the inhibition of WEE1[J/OL]. *Tumour Biol*, 2017, 39(10): 1010428317706224[2019-03-20]. https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1010428317706224?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. DOI: 10.1177/1010428317706224.
- [7] RODRIGUEZ-BARRUECO R, NEKRITZ E A, BERTUCCI F, et al. miR-424(322)/503 is a breast cancer tumor suppressor whose loss promotes resistance to chemotherapy[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(6): 553-566. DOI: 10.1101/gad.292318.116.
- [8] WU D, LU P, MI X, et al. Downregulation of miR-503 contributes to the development of drug resistance in ovarian cancer by targeting PI3K p85[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(3): 699-707. DOI: 10.1007/s00404-018-4649-0.
- [9] JIANG L, ZHAO Z, ZHENG L, et al. Downregulation of miR-503 promotes ESCC cell proliferation, migration, and invasion by targeting cyclin D1[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15(3): 208-217. DOI: 10.1016/j.gpb.2017.04.003.
- [10] ABNET C C, ARNOLD M, WEI W Q. Epidemiology of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(2): 360-373. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.08.023.
- [11] MINASHI K, NIHEI K, MIZUSAWA J, et al. Efficacy of endoscopic resection and selective chemoradiotherapy for stage I esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(2): 382-390. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.04.017.
- [12] LI J, ZHAO Z, DU G, et al. Safety and efficacy of pulsed low-dose rate radiotherapy for local recurrent esophageal squamous cell carcinoma after radiotherapy: Study protocol for a prospective multi-center phase II trial[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(26): e16176 [2019-03-20]. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=31261551>. DOI: 10.1097/md.00000000000016176.
- [13] ZHOU Y, CHU L, WANG Q, et al. CD59 is a potential biomarker of esophageal squamous cell carcinoma radioresistance by affecting DNA repair[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 887[2019-03-20]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0895-0>. DOI: 10.1038/s41419-018-0895-0.
- [14] ZHOU Y, SU Y, ZHU H, et al. Interleukin-23 receptor signaling mediates cancer dormancy and radioresistance in human esophageal squamous carcinoma cells via the Wnt/Notch pathway[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(2):177-188. DOI: 10.1007/s00109-018-1724-8.
- [15] CARDOSO A M S, SOUSA M, MORAIS C M, et al. MiR-144 overexpression as a promising therapeutic strategy to overcome glioblastoma cell invasiveness and resistance to chemotherapy[J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(16): 2738-2751. DOI: 10.1093/hmg/ddz099.
- [16] LONG L, ZHANG X, BAI J, et al. Tissue-specific and exosomal miRNAs in lung cancer radiotherapy: from regulatory mechanisms to clinical implications[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(5): 4413-4424. DOI: 10.2147/cmar.S198966.
- [17] LI B, LIU L, LI X, et al. miR-503 suppresses metastasis of hepatocellular carcinoma cell by targeting PRMT1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(4): 982-987. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.169.
- [18] BARAN-GALE J, PURVIS J E, SETHUPATHY P. An integrative transcriptomics approach identifies miR-503 as a candidate master regulator of the estrogen response in MCF-7 breast cancer cells[J]. *RNA*, 2016, 22(10): 1592-1603. DOI: 10.1261/rna.056895.116.
- [19] BARGIELA-IPARRAGUIRRE J, PRADO-MARCHAL L, FERNANDEZ-FUENTE M, et al. CHK1 expression in gastric cancer is modulated by p53 and RB1/E2F1: implications in chemo/radiotherapy response[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 1519[2019-03-20]. <https://www.nature.com/articles/srep21519>. DOI: 10.1038/srep21519.
- [20] YU Y, DING S, LIANG Y, et al. Expression of ERCC1, TYMS, TUBB3, RRM1 and TOP2A in patients with esophageal squamous cell carcinoma: A hierarchical clustering analysis[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6): 1578-1582. DOI: 10.3892/etm.2014.1659.
- [21] BAUMAN J E, AUSTIN M C, SCHMIDT R, et al. ERCC1 is a prognostic biomarker in locally advanced head and neck cancer: results from a randomised, phase II trial[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(8): 2096-2105. DOI: 10.1038/bjc.2013.576.
- [22] CHIU T J, CHEN C H, CHIEN C Y, et al. High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area[J/OL]. *J Transl Med*, 2011, 9: 31[2019-03-22]. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-31>. DOI: 10.1186/1479-5876-9-31.
- [23] DE ALMEIDA V H, DE MELO A C, MEIRA D D, et al. Radiotherapy modulates expression of EGFR, ERCC1 and p53 in cervical cancer[J/OL]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 51(1): e6822[2019-03-22]. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2018000100608&lng=en&nrm=iso&tlng=en. DOI: 10.1590/1414-431x20176822.
- [24] LIU Z G, CHEN H Y, CHENG J J, et al. Relationship between methylation status of ERCC1 promoter and radiosensitivity in glioma cell lines[J]. *Cell Biol Int*, 2009, 33(10): 1111-1117. DOI: 10.1016/j.cellbi.2009.07.004.

[收稿日期] 2019-03-26

[修回日期] 2019-08-13

[本文编辑] 黄静怡